第1卷第1期　　动物学研究　　Vol. 1, No. 1
1980年2月　　ZOOLOGICAL RESEARCH　　Feb., 1980

两栖动物精子形成过程中细胞核内碱性蛋白质的更替现象

李靖炎

中国科学院昆明动物研究所

摘　　要

1、在分属于蝾螈科、蛙科、姬蛙科、雨蛙科与蟾蜍科的八种两栖动物上，用细胞化学的方法研究了精子形成过程中核内碱性蛋白质的变化。

2、细胞化学研究的结果表明，所有八种两栖动物的精子核中的碱性蛋白质，都是跟一般细胞核（包括精细胞的核在内）中的碱性蛋白不相同的。它们比一般细胞核中的组蛋白含有较多的精氨酸，碱性也更强一些。

3、在六种两栖动物上，用热三氯醋酸（5%，90°C）处理了用酒精固定的精巢的切片，比较了所得到的结果。一般的细胞核与中期染色体都不破坏，但是精子核的反应则因种而异。

只要处理五分钟，黑眶蟾蜍的绝大部分的精子核就都破坏了；处理十五分钟以后就全部都消失了。

臭蛙的精子核在经十五分钟处理以后绝大多数都遭到了破坏。

滇蛙的精子核在经十五分钟处理以后，大部分遭到了破坏；处理三十分钟以后，就全部都消失了。

在云南小狭口蛙，处理十五分钟以后只有小部分的精子核遭到了破坏；在经过三十分钟处理后，方才大部分被破坏。

多疣狭口蛙的精子核在经十五分钟的处理以后，只有很少的一部分被破坏；处理三十分钟以后，遭到破坏的仍然只占小部分。

至于华西雨蛙，直到处理三十分钟以后，方才有些精子核开始表现出发生破坏的迹象。

如果用热苦味酸的饱和水溶液处理（60°C、3小时）代替热三氯醋酸处理，则臭蛙、滇蛙与黑眶蟾蜍的精子核就完全都不破坏。

本文于1979年12月26日收到。

上述的结果表明，黑眶蟾蜍、臭蛙和滇蛙精子核中的蛋白可以确定是鱼精蛋白，云南小狭口蛙的或者也可以列入鱼精蛋白的范围，多疣狭口蛙和华西雨蛙的看来是介乎于鱼精蛋白和组蛋白之间的碱性蛋白。

由此可见，两棲动物的精子核中的蛋白质是因种而异的，它们构成为一个从鱼精蛋白到介乎于鱼精蛋白和组蛋白两者之间的碱性蛋白的连续的系列。

4、我们的工作结果驳斥了 H.Y.C.Hew 与 D.P.Bloch 两人认为在蛙的精子形成过程中不发生碱性蛋白质的更替的观点。文中并对他们为什么会作出这种轻率的论断，进行了分析。我们的工作经验表明，为了要确证精子核中的碱性蛋白跟一般细胞核中的是一样的，就必须进行系列性的实验（例如一系列不同长短的处理时间等等），并且证明这两者在所有的场合下都是表现得相同的。而这也正就是 Hew 与 Bloch 根本没有去作的。

5、作者现在的和过去的一系列工作，连同有关的文献资料都说明，精子形成过程中核内碱性蛋白发生更替的现象在后生动物中间是广泛存在着的，而且它们的精子核中所含的蛋白质是因种而异、多种多样的，从典型的鱼精蛋白、各种介于鱼精蛋白与组蛋白之间的碱性蛋白，直到组蛋白型的蛋白都有。

这种碱性蛋白系列的连续性看来是意味着，不仅在精子核中的蛋白是鱼精蛋白或介于鱼精蛋白与组蛋白之间的蛋白质的情况下，精子形成过程中要发生核内碱性蛋白的更替，而且即使是在精子核中所含的是一种组蛋白型的蛋白的情况下，核内碱性的更替也仍然还是要发生，只不过精细胞的细胞核中的组蛋白是被精子核中的另外一种组蛋白所取代而已。

在此基础上作者提出了这样设想：在一切种类的动物的鞭毛型精子（线形精子）的形成过程中，精细胞细胞核中原有的碱性蛋白都合规律地必然地要被碱性更强的碱性蛋白所取代；核内碱性蛋白的更替，在整个过程中至少要发生一次。

6、关于黑眶蟾蜍与滇蛙的研究表明，在它们的精子形成过程中，也像在蜗牛的同一过程中一样，首先是精细胞的细胞核中的组蛋白为一种过渡性的碱性蛋白所取代，随后后者又为鱼精蛋白所取代。精子形成过程中核内碱性蛋白的更替不只发生一次的情况，大约并不是极少的。

一、引 言

在动物的精子形成过程中，精细胞的核转变成为精子的核。这时细胞核的物理化学状态、亚显微结构以及化学组成，全都发生了剧烈的变化。虽则早在1897年，Miescher 就已在鲑的精子核中发现了一般的细胞核所没有的鱼精蛋白，但是直到1956年，M. Altert 的细胞化学工作方才弄清楚了，鲑精子核中的鱼精蛋白是在精子形成（Spermiogenesis）的过程中发生的。已知精细胞的核中所含的碱性蛋白仍然还是组蛋白；只是在精细胞的核转化为精子核的过程中，组蛋白方才为鱼精蛋白所替代[5]。此后的一系列研究表明，在许多动物的精子形成过程中，细胞核内的碱性蛋白都发生有更替，虽则代替原来的组蛋白的并不都是典型的鱼精蛋白。这种更替已经在下列材料中为作者与其他

人的细胞化学研究所发现：猕猴[1]、豚鼠[6]、大鼠[10]、小鼠[10,25,26]、鸡[3]、鲑鱼[5]、多种蝗虫[2,13,11,12]、蟋蟀[23]、果蝇[14,15,16]、蜗牛[8]、乌贼[10,9]。作者对田螺所进行的细胞化学工作（未发表）也同样证明是有更替。生物化学的分析表明，这种更替在许多种鱼类[18,28,30]、蜮Patella vulgata与P.coerulea[据18]、也是存在的，因为它们的精子核中所含的都不是组蛋白，而是鱼精蛋白或介于鱼精蛋白与组蛋白之间的碱性蛋白。

生物化学的资料[28,29]和细胞化学的资料[20]都表明，这种更替在牛也是存在的。

H.Ris指出，在章鱼的精子形成过程中，细胞核内粗100Å的去氧核糖核蛋白丝会分裂成为粗40Å的两根。他证明了这种变化是由于去氧核糖核蛋白中的组蛋白为鱼精蛋白所替代的缘故[33]。

上面所列举的事例说明，在动物的精子形成过程中，碱性蛋白的更替是广泛存在的。但是也有一些报导说，有些动物的精子核中的蛋白质仍然是组蛋白。如此，则更替现象在它们似乎是并不存在的。例如 Hamer (1955) 即说乌贼与海胆的精子核中的蛋白质是组蛋白[21]。关于乌贼他显然是弄错了，Bloch (1962、1963) 的工作清楚地说明乌贼的精蛋白乃是鱼精蛋白[10,9]。但是他关于海胆的报导却为 Ris (1962) 所证实。后者发现，在章鱼的精子形成过程中所发生的那种去氧核糖核蛋白丝的粗细变化，在海胆中是没有的[33]。不过后来 Saleri (1964) 的工作表明其实并不是如此[据24]。而关于海胆 Arbacia lixula 的精子核中的蛋白质的生物化学分析，则直接说明了它们并不是组蛋白，而是介乎于组蛋白与鱼精蛋白之间的碱性蛋白[据18]。因此，碱性蛋白的更替在海胆也同样是发生的。

这一系列的事实使作者设想：在动物的典型精子（鞭毛精子）的形成过程中，细胞核内碱性蛋白质的更替并不是偶然的、个别的，而是普遍性的规律，正如同在动物的精子形成过程中细胞核内要发生非碱性蛋白质的排除[1,2,3]和复杂的亚显微结构变化[13,27,31,17,22]一样。

但是仍然还是存在有一些与我们的设想相矛盾的资料。据报导，鲤鱼[28]和泥鳅[32]精子核中的蛋白质即是组蛋白。而 Hew 与 Bloch 关于蛙的细胞化学研究则说明，碱性蛋白质的更替在蛙的精子形成过程中似乎也是不发生的，精子核中的蛋白质仍然还是组蛋白，而且这种组蛋白用细胞化学的方法是检查不出与一般细胞核中的组蛋白有什么差别的[据10,9]。

为了检验我们的设想究竟能否立得住脚，我们进行了研究。本文所报导的是我们关于两栖动物的研究结果。

二、材　料

共在昆明地区的八种两栖动物上作了研究，其中包括了有尾目的一个科一个属和属于无尾目四个亚目七个科中的两个亚目四个科的五个属。

有尾目、蝾螈亚目、蝾螈科：滇螈 *Hypselotriton wolterstorffi Boulenger*。

无尾目、异凹亚目、蛙科：种未能确定的一种Rana sp、无指盘臭蛙*Rana grahami Boulenger*、滇蛙*Rana pleuraden Boulenger*。姬蛙科：多疣狭口蛙*Kalnula verr-*

ucosa Boulenger、云南小狭口蛙*Calluela yunnanensis Boulenger*。

前凹亚目、雨蛙科：华西雨蛙 *Hyla annectans Jerden*。蟾蜍科：黑眶蟾蜍*Bufo melanostictus Schneider*。

关于滇螈的工作是在1963年秋进行的。种未能确定的一种蛙是段幸生与钟金颜两同志采自昆明花红洞，有关的工作在1964年冬进行。无指盘臭蛙为何济之同志与周明培同志于1964年十月采自昆明筇竹寺地区，工作于1964年冬和1966年夏进行。蟾蜍、雨蛙、滇蛙、狭口蛙与小狭口蛙都是在1965年五、六两月采自昆明黑荞母地区，有关的工作则是在1966年夏进行。其中的滇蛙、狭口蛙与小狭口蛙是黑荞母生产队的熊忠毅与熊忠佩两同志所采集的。

在切片制作方面，钟金颜同志前后协助作了许多工作；种的鉴定是周绮楼与彭鸿绶两同志进行的；在照片摄制上，何济之同志与郑子修同志帮了许多忙；谨在此一并志谢。

三、 研究方法与结果

(一) 滇　螈

精巢以甲醛钙固定，作石腊切片。作各种检验时，以甲醛钙固定的黑股车蝗 *Gastrimargus nubilis Uvarov* 的精巢石腊切片作为对照。黑股车蝗的精子形成过程中核内碱性蛋白的变化是我们以前研究了的[2]。

以我们所改良的 Alfert与Geschwind 的三氯醋酸—固绿碱性溶液法显示碱性蛋白：切片先经三氯醋酸热处理（5％TCA，90°C，15分钟）；70％酒精洗涤三次，各十分钟；逐步降到水中；通过0.005％Na_2CO_3液进入含0.005％Na_2CO_3的0.025％固绿溶液中，染半小时；在0.005％Na_2CO_3液中分色3—10分钟；水洗，丙酮急速脱水，二甲苯透明，合成树脂封存。各种细胞的细胞核、染色体与精子核全都鲜明着色，细胞质则无色（照片一）。滇螈的精子核并不因TCA热处理十五分钟而破坏。

如果在 TCA 热处理除去核酸以后，用 HNO_2脱除蛋白质中的赖氨酸的 6—NH_2，之后再染色，则可以得到完全不同的形象。经过一系列的不同长短时间的试验以后，我们发现处理四小时（冷/5％TCA 二十毫升中加入一克 $NaNO_2$，放入切片，密封，不震摇，使 $NaNO_2$缓慢溶解）可以得到最明显的结果：细胞质、各种细胞的核、染色体等完全都不着色，只有精子核和正在进行变态的精细胞的核着色。在此值得注意的是，在完全相同的条件下，一般细胞核与染色体全都不着色，但滇螈精子核的着色比起蝗虫来显然要浅得很多。这说明滇螈精子核中的蛋白质虽然比一般细胞核与染色体中的组蛋白含有较多的精氨酸，但是比起蝗虫精子核中的蛋白质来，其所含的精氨酸比例显然要低得多。

切片经 TCA 热处理及洗涤以后，通过0.005*N*的 NaOH 液，进入含0.005N NaOH 的0.025％固绿溶液，在其中染十分钟，之后在0.005*N* NaOH分色三分钟(其他同前)。结果，蝗虫的细胞质、染色体与一般的细胞核全都不着色，精子核与发育形成中的精子

核则鲜明地着色；滇螈的一般细胞核与染色体基本上不着色，成长的与发育形成中的精子核则着色。滇螈与蝗虫相比，一般细胞核与精子核在着色上的差异显然要小得多。这说明，滇螈精子核中的蛋白质的等电点要高于一般细胞核中的组蛋白的等电点，即碱性要更强一些，但是比起蝗虫精子核中的蛋白质来，则又要低一些。

这两组实验的结果说明，在滇螈的精子形成过程中，碱性蛋白同样也是要发生更替的，其精蛋白的碱性比组蛋白高，所含的精氨酸比例也大于组蛋白。但是滇螈的精蛋白与组蛋白之间的差异，是远赶不上蝗虫的两者之间的差异的。而这一点就决定了这样的一种情况：如果所用的方法不够灵敏，或者工作作得比较粗糙，滇螈的这两种碱性蛋白之间的差异也就可能显示不出来。为了提高灵敏度，进行系列性的试验（处理不同的时间、使用不同碱性强度的染液等等）是必要的。但是这一点，Hew与 Bloch 是没有注意到的。

（二）种未能确定的一种蛙*Rana sp.*

滇螈的研究使作者很怀疑 Hew与 Bloch关于蛙的研究结果，因此在第二年我们又在一种蛙上进行了研究，作了几组系列性的实验，并以pH 7 的0.03%偶氮洋红*G*溶液代替pH 8 的固绿溶液。根据我们所进行的专门研究，我们从四十一种酸性染料与指示剂中所挑选出来的偶氮洋红*G*，是一种最适于显示碱性蛋白的染料，灵敏，选择性高，而且在中性的溶液中即已能够专特地显示碱性蛋白。我们已经在一系列的材料上证明了，我们所提出的使用这种染料的染色方法是比 Alfert与Geschwind（1953）的三氯醋酸—固绿法和我们的改良法[2]都更为优越的[4]。

精巢以95%酒精或甲醛固定。切片经 TCA 热处理和洗涤以后，在pH 7 的0.03%偶氮洋红*G*液中染半小时，之后在蒸馏水中分色三分钟，丙酮一次脱水，二甲苯透明。所得形象与Feulgen反应片是高度一致的，细胞质无色，核与染色体则染作红色。

为了显示蛙精子核中的碱性蛋白与一般细胞核中的组蛋白之间可能有的差别，切片经TCA热处理（15分钟）和洗涤后，在HNO_2液中（5%TCA 20 毫升中加入$NaNO_2$一克，密封，不震摇，室温20°C）处理30分钟、一小时、二小时、四小时、八小时，之后再用偶氮洋红染色。用HNO_2脱∈—NH_2半小时至一小时后，精子核与一般的细胞核都着色；处理二小时后，精子核与发育形成中的精子核着色，一般的细胞核与染色体则无色或极微地着色；处理四小时后，切片中只有少数精子核束微微着色；处理八小时后，一切结构均不着色。用pH 8 的0.025%固绿液染，也得到了类似的结果。

切片在以TCA除去核酸以后，投入事先已调为中性的10%福尔马林中泡五小时或十五小时半，以封闭∈—NH_2，之后再用偶氮洋红染色。结果处理五小时的切片中只有精子核束微着色，而在处理十五小时半的切片中，整个切片中只有部分的精子核束极微地着一点颜色。

经过TCA热处理的切片以不同pH的偶氮洋红液染色，也显示出蛙的精蛋白与组蛋白是不同的。在以Na_2CO_3及NaOH调为pH 9 的0.015%偶氮洋红液染色（30分钟）时，精子核着色深，而精母细胞等的核则着色浅。以溶于近饱合的Li_2CO_3液中的0.015%偶氮洋红染色时（pH10左右），整个切片的着色用肉眼看比前片浅得多，但在显微镜下精

子核着色仍然深，一般的细胞核则浅着色。以含0.35%NaOH的染液（0.015%，pH12左右）染色，切片中即只有成长的与发育形成中的精子核着色，一般的细胞核与中期染色体全都不着色。

上述的五组实验的结果都表明了这种蛙的精蛋白是与一般细胞核中的组蛋白不同的，含有较大比例的精氨酸，碱性也显然更强。这说明在蛙的精子形成过程中，核中的碱性蛋白也是要发生更替的，从而否定了Hew与 Bloch 的结论。上述的三组实验再次证明了，在精蛋白与组蛋白间的差别不是很大时，进行系列性的实验是非常必要的。Hew与 Bloch 未能显示出蛙的精蛋白与组蛋白之间的差异，看来很可能就是由于没有进行系列性的实验。

（三）无指盘臭蛙

精巢以90%酒精或10%福尔马林固定。我们在经TCA热处理后用偶氮洋红或固绿染色的切片上发现，臭蛙的精子核明显地遭到了破坏，一般的细胞核则完全不受影响（照片二、三）。进一步的工作表明，如果改用60°C的苦味酸饱合水溶液处理三小时，来代替15分钟的TCA热处理，则精子核就完全不破坏（照片四）。这确切地说明，臭蛙精子核中的蛋白质乃是鱼精蛋白性质的。因此，在臭蛙的精子形成过程中，核内碱性蛋白之发生更替乃是毫无疑义的。

（四）滇 蛙

材料用纯酒精固定。

按Black与Ansley（1964）的氨银法[7]显示碱性蛋白时，各种细胞的细胞核以及精子核和中期染色体全都深显色，细胞质等无色。

氨银反应与孚尔根反应都表明切片中含有很大量的精子核。但是在经TCA热处理十五分钟以后再用偶氮洋红染色的切片中，精子核却少得多了，虽则一般的细胞核并没有什么减少的迹象。经仔细检查以后，发现这是由于许多的精子核遭到了破坏。在切片中可以看到许多半破坏了的精子核以及精子核基本上破坏以后所余下的残迹（照片六）。利用相差显微镜进行观察，可以看到有大量的精子核已完全被溶去，只留下了其外方的薄层的细胞质。

如果把TCA的热处理延长为三十分钟，一般的细胞核，包括精细胞的核在内，仍然不破坏，但是精子核却全部都溶解消失了，而不是像处理十五分钟时那样还残留下许多。精子核束此时在低倍镜下变成了淡着色的云状结构（照片七）。但是在用油浸镜头进行观察时，可以看到这种云状的结构实际上是由精子核溶去以后所留下的纵长的空洞和精子核外的薄层的细胞质所构成的（照片八）。后者被浅着色。这或者是由于它们吸附了少量的精蛋白的缘故。

在以苦味酸处理（饱合水溶液，60°C，三小时）代替TCA热处理来除去核酸时，精子核的破坏就完全不发生（照片五）。这表明，滇蛙的精蛋白也是鱼精蛋白性质的。

如果切片在经TCA热处理(15分钟)后，先经HNO_2处理(5%TCA 20ml加入$NaNO_2$一克，投入切片后密封，摇动，以使$NaNO_2$迅速溶解，处理90分钟）或福尔马林处理

（10%，调为中性，处理70或120分钟），之后再用偶氮洋红染色，则一般的细胞核都不着色，大量的精子核被破坏，结果只有部分的精子核束和变态中的精细胞的核被着色。这说明，滇蛙的精蛋白与变态中的精细胞的核内碱性蛋白，都含有高量的精氨酸。但是这两者彼此又不相同，因为后一种碱性蛋白并不会在热TCA处理中溶解。这样，在滇蛙的精子形成过程中已有了三种相互更替的碱性蛋白：精细胞细胞核中原有的组蛋白⟶变态中的精细胞的核中的高精氨酸碱性蛋白⟶精子核中的鱼精蛋白性的精蛋白。这是与蜗牛的情况[8]相似的。

（五）多疣狭口蛙

材料以纯酒精固定。切片在经TCA偶氮洋红法染色以后，所得结果与用氨银法染色时相同，精子核并不破坏（照片九）。但是鉴于滇蛙的情况，所以对切片进行了反复的检查，结果发现有很少的精子核也有遭到破坏的迹象。但是即使把TCA热处理时间延长到30分钟，成熟的精子核也只有小部分遭到破坏，大部分仍然还是完好的。

切片经TCA热处理后，用HNO_2处理90—120分钟（方法同前节中所述），或用10%福尔马林处理120分钟，再用偶氮洋红染色，切片中就只有精子核束与变态中的精细胞的核着色，其他结构均无色（照片十、十一）。TCA热处理后以含0.15%NaOH的0.03%偶氮洋红染色，也得到同样的结果。这说明，狭口蛙的精蛋白的精氨酸含量和等电点都是远高于组蛋白的。因此，在狭口蛙的精子形成过程中，也同样发生有核内碱性蛋白质的更替。

（六）云南小狭口蛙

材料的固定与染色同于多疣狭口蛙，结果也一致（照片十四）。不同之处只在于，云南小狭口蛙的切片经TCA热处理15分钟以后，精子核中就已经有少部分被破坏，而在热处理30分钟以前，就大部分都破坏了，只留下了小部分（照片十二、十三）。因此，云南小狭口蛙的精蛋白对热TCA的抵抗力，是介乎于滇蛙的与多疣狭口蛙的精蛋白之间。

（七）华西雨蛙

材料以纯酒精固定。切片经TCA—偶氮洋红法染色以后，所得形象与孚尔根反应相同。经仔细检查，也看不到有精子核破坏的迹象。但是在把TCA热处理时间延长为30分钟时，则可以看到有些精子核内出现了由于精蛋白溶失而形成的小泡。这说明它们也在开始破坏了（照片十五）。

切片经TCA热处理及10%福尔马林处理（120分钟）后，就只有精子核与变态中的精细胞的核能被偶氮洋红染色。切片经苦味酸热处理和HNO_2处理（60分钟），结果也是如此（照片十六）。因此，华西雨蛙的精蛋白以及变态中的精细胞的核内碱性蛋白，在精氨酸的含量比例上，也是比它们的组蛋白为高的。

值得一提的是，在以含不同浓度的NaOH的偶氮洋红液染经过了TCA热处理的切片时，我们发现，雨蛙的组蛋白的碱性似乎比狭口蛙等的组蛋白的要强得多。在狭口蛙的

切片上，染液中含有0.15%NaOH，就已可使一般的细胞核都不着色，而只染上精子核。但是在雨蛙的切片上，染液中含NaOH 0.15—0.2%时，所有的细胞核以及染色体全都被染色；含0.3%时，精子核着色清楚，一般细胞核则着色模糊；在NaOH浓度高达0.35%时，精子核着色清楚而一般的细胞核不着色（染色时间都是30分钟，染后专门分色，经水洗后用丙酮一次脱水）。

（八）黑眶蟾蜍

材料以纯酒精固定。在孚尔根反应片以及用氨银法染色的切片中，都可以看到大量的精子核。但是在以TCA—偶氮洋红法染色后，精子核就只剩下了少量的残迹，虽则一般的细胞核全都完好（照片十八）。切片经TCA热处理以后用氨银法染色时，破坏了的精子核束显现为一团团的黑色颗粒聚集物。用相差显微镜直接观察经TCA热处理15分钟的切片，也同样看到精子核被破坏而一般的细胞核者不受影响。

我们试着把TCA的热处理时间缩短为五分钟，之后再用偶氮洋红染色。结果发现，经这样短暂的 TCA 热处理以后，大部分的精子核都已经遭到了破坏，但是还残存了好些，情况与云南小狭口蛙的片经TCA热处理30分钟以后差不多。

改用苦味酸处理来代替 TCA 热处理时，精子核即完全不破坏；无论用偶氮洋红来染，还是用氨银法来染，都是一样（照片十七）。

苦味酸热处理后继之以HNO_2处理（65分钟），之后再用偶氮洋红染色，切片中就只有精子核与变态中的精细胞的核着色（照片十九）。但是在经TCA热处理与HNO_2处理的同样染色的切片中，则就只有变态中的精细胞的核清楚地着色了，因为精子核都已破坏，而一般的细胞核又都不着色或者只是微微地有一点颜色（照片二十）。这种结果清楚地说明，在蟾蜍的精子形成过程中，同样是有三种核内碱性蛋白在更替：组蛋白—→富于精氨酸但非鱼精蛋白的碱性蛋白—→鱼精蛋白。

四、讨　　论

在本研究中，我们可以看到，不同种两栖动物的精子核中的蛋白质并不是一致的。从滇蛙、臭蛙、蟾蜍、雨蛙、狭口蛙、小狭口蛙等六种蛙来看，就可以看到有这样几种不同的情况：1、黑眶蟾蜍，精子核在经 TCA 热处理 5 分钟以后就大部分都遭到了破坏；处理15分钟以后就全部都破坏了。2、无指盘臭蛙，TCA热处理15分钟以后，精子核大体上都遭到了破坏。3、滇蛙，TCA热处理15分钟后大部分精子核被破坏；热处理30分钟以后全部被破坏。4、云南小狭口蛙，处理15分钟后，少部分精子核被破坏；处理30分钟以后则大部分被破坏。5、多疣狭口蛙，处理15分钟后只有很少的精子核被破坏；处理30分钟后也只有小部分被破坏。6、华西雨蛙，TCA热处理30分钟以后，才有些精子核开始显露出遭到破坏的迹象。

在这样一个性质逐步过渡的连续序列中，至少前三个种的精子核中的蛋白质可以确定为是典型的鱼精蛋白，因为它们的精子核在热TCA处理15分钟后即遭到破坏，而在改用热苦味酸来除去核酸时，这种破坏却不会发生。云南小狭口蛙的精子核中的蛋白质或

者也可以列入鱼精蛋白的范围。多疣狭口蛙与华西雨蛙的则可以认为是处于鱼精蛋白与组蛋白之间。

我们的工作否定了Hew与Bloch关于蛙的精子核中的蛋白质是典型的组蛋白，在它们的精子形成过程中不发生核内碱性蛋白的更替的论断。在我们所研究的八种材料中，没有一种的精子核中的蛋白质是与一般细胞核中的组蛋白相同的。在所有这八种两栖动物的精子形成过程中，全都发生了核内碱性蛋白质的更替。

Hew与Bloch认为蛙的精子核中的蛋白质跟一般细胞核中的组蛋白，用细胞化学的方法是无从加以区别的。我们的工作完全否定了这个论断。我们的实际工作经验，使人怀疑他们之所以会得到他们的结论，只不过是由于他们所应用的方法不够灵敏，而他们的工作又不够细致严谨的缘故。我们的经验表明，为要确定精子核与一般细胞核中的碱性蛋白确实是一样的，必须进行系列性的实验（如一系列不同长短的处理时间、一系列不同的反应物质浓度、不同的 pH 值等等），并且证明它们在各种不同的场合下，表现全都是一致的。如果仅仅根据这两者在某种特定的情况下表现是一致的，便作出它们是相同的判断，那显然是太轻率了。

本研究进一步加强了我们凭藉过去的工作结果和文献资料所建立起来的这样一个信念：在动物的鞭毛型精子的精子形成过程中，核内碱性蛋白质的更替乃是必然的、普遍的、规律性的，而不只是少数动物所特有的。

虽然至今还缺少许多门与纲的有关这个问题的资料，而某些资料又认为有些动物的精蛋白就是一些组蛋白，但是我们的工作表明，在不同种类的动物中间，精子核中的蛋白质是彼此差别很大的。结合到文献资料和过去的工作结果，显然可以看出，不同种动物精子核中的蛋白质完全可以排列成为一个从典型的鱼精蛋白朝向组蛋白的方向转变的连续的过渡系列。这种连续的系列的存在，使人可以设想，即使在精子核中的蛋白质当真是一种组蛋白的情况下，精子形成过程中碱性蛋白的更替仍然还是要发生的，只不过是以一种新的组蛋白替换了精细胞的细胞核中，原有的组蛋白而已。这样一种设想是很容易用标记氨基酸在鲤鱼或泥鳅身上进行放射自显影的研究而得到检验的。

可以设想，核内碱性蛋白质的更替，以及核内各种非碱性蛋白质的排除，乃是动物精子形成过程中，细胞核内所发生的复杂的亚显微结构变化[13,27,31,17,22]的化学基础。这种复杂的亚显微结构的变化显然也是具有普遍性的。

在蜗牛的精子形成过程中，精细胞的细胞核中原有的蛋白为一种介于组蛋白与鱼精蛋白之间的过渡性蛋白所替代，而后者后来又为鱼精蛋白所取代[8]。后来发现，乌贼[5]、蟋蟀[23]的情况也是如此。我们的工作表明，滇蝾和黑眶蟾蜍的情况也是这样的。进化上彼此相距很远的动物，在它们的精子形成过程中，碱性蛋白的更替情况却是一致的。这一事实说明，它们的精子形成过程不仅在形态变化方面彼此很相似，而且在内在的机制方面，也是深刻地一致的。

在细胞化学工作中，过渡性碱性蛋白为鱼精蛋白所替代之所以能被显示出来，是利用了鱼精蛋白会为热TCA所溶解的特性。但是如果有某种鱼精蛋白或类鱼精蛋白并不会为热TCA所溶解破坏，则这种更替就将发现不出来。例如鸡的精子核中的蛋白质—鸡精蛋白，从其氨基酸构成上来看，属于鱼精蛋白类[18, 19]，但是鸡的精子核却不会为TCA

热处理所破坏[5，3]。在牛[28]和猕猴[1]，情况看来也是如此。如果在它们的精子形成中，碱性蛋白的更替也符合上述的顺序，用目前的细胞化学方法却不能把第二次更替显示出来。因此，在动物的精子形成过程中，碱性蛋白发生不只一次的更替的情形，可能是比目前所已知的更多得多的。

参 考 文 献

1. 李靖炎，1963、猕猴精子形成过程中核内蛋白质变化的细胞化学研究，遗传学集刊，1963，第三集，第102—109页。

2. 李靖炎，1963、蝗虫精子形成过程中核内蛋白质变化的细胞化学研究，遗传学集刊，1963年第三集，第110—114页。

3. 李靖炎，1964、鸡精子形成过程中核内原有蛋白的消失与鸡精蛋白的发生，实验动物学专业学术讨论会论文摘要汇编，第162—163页。

4. 李靖炎，1964、碱性蛋白的染色方法的研究。（中国动物学会三十周年会议上散发）

5. Alfert, *M.*; 1956. Chemical differentiation of nuclear proteins during spermatogenesis in the Salmon. J. Biophys. Biochem. Cytol., 2, 2, 109—114.

6. Alfert, *M.*; 1957. Some cytochemical contributions to genetic chemistry. in"A Symp. on The Chemical Basis of Heredity",Johns Hopkins Press P.186—194.

7. Black, M. M. and H. R. Ansley; 1964. Histone staining with ammoniacal Silver. *Science*, **143**, 3607, 693—695.

8. Bloch, D. P., H. Y. C. Hew; 1960. Schedule of spermatogenesis in the pulmonate snail Helix aspersa, with special reference to histone transition. *J. Cell Biol.*, **7**, 3, 515—532.

9. Bloch, D. P; 1962. Histone synthesis in non-replicating chromosomes. *J. Histochem. Cytochem.*, **10**, 2, 137—144.

10. Bloch, D. P; 1963. The histones; synthesis, transitions, and functions in "The Cell in Mitosis", Academic Press, P. 205—221.

11. Bloch, D. P., 1964. Genetic implications of histone diferentiation. in "The Nucleohistones", Holden-Day, Inc., P. 335—342.

12. Bloch, D. P. and S. D. Braek,; 1964. Evidence for the cytoplasmic synthesis of nuclear histone during spermiogenesis in the grasshopper Chortophaga viridifasciata. *J. Cell Biol.*, **22**, 2, 327—340.

13. Das C. M. S. and H. Ris,; 1958 Submicroscopic organisation of the nucleus during spermiogenesis in the grasshopoer. *J. Biophy. Biochem., Cytol.*, **4**, 1, 129—131.

14. Das, C. C. B. P. Kaufmann, and H. Cay,; 1964. Autoradiographic evidence of synthesis of an arginine-rich histone during spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Nature*, **204**, 4962, 1008—1009.

15. Das, C. C., B. P. Kaufmann, and H. Gay,; 1964. Histone-protein transition in *Drosophila melanogaster*. I. Changes during spermatogenesis. *Exp. Cell Res.*, 35, 3, 507—514.

16. Das, C. C., B. P. Kaufmann, and H. Gay,; 1964. Histone-protein transition in *Drosophila melanogaster*. II. Changes during early embryonic devolopment. *J. Cell Biol.* 23, 3, 423—430.

17. Fawcett, D. W.; 1958. The structure of the mammalian spermatozoon. *Intern. Rev. Cytol.*, 7, 195—234.

18. Felix, K., H. Fischer, A. Krekels,; 1956. protamines and nucleoprotamines *Progr. Biophys. Chem.*, 6, 1—23.

19. Felix, K.; 1960. Protamines. *Advances in protein chemistry*, 15, 1—56.

20. Gledhill, B. L., M. P. Gledhill, R. Rigler, N. R. Ringertz,; 1966. Changes in deoxyribonucleoprotein during spermiogenesis in the bull *Exp. Cell Res.*, 41. 3, 652—665.

21. Hamer, D.; 1955. The composition of the basic proteins of echinoderm sperm. *Biol. Bull.*, 108, 1, 35—39.

22. Kaye, J. S.; 1958. Changes in the fine structure of nuclei during spermiogenesis. *J. Morph.*, 103, 2, 311—321.

23. Kaye, J. S.; 1963, in "The cell in Mitosis", Academic press, P.221—223.

24. Mazia, D.; 1965. The partitioning of genomes. in "Function and structure in micro-organisms", Cambridge University press, p. 379—394.

25. Monesi V.; 1964. Autoradiographic evidence of a nuclear histone synthesis during mouse spermiogenesis in the absence of detectable quantities on nuclear ribonucleic acid. *Exp. Cell Res.*, 36, 3, 683—688.

26. Monesi, V.; 1965. Synthetic activities during spermatogenesis in the mouse, RNA and protein. *Fxp. Cell Res.*, 39, 1, 197—224.

27 Rebhum, L. J.; 1957, Nuclear changes during spermiogenesis on a pulmonate snail. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 3, 4, 509—524.

28. Vendrely, C. A. Klobloch, et R. Vendrely,; 1956. Contribution à letude biochemique comparée de diveraes desoxyri bonucleoproteines dorigine animale. *Biochim. Biophys. Acta*, 19, 3, 472—479.

29. Vendrely, R. A. Knobloch, and C. Vendrely,; 1957. An attempt of using biochemical methods for cytochemical problems. The deoxyribonucleus of spermatogenetic cells of bull testis. *Exp. Cell Res. Suppl.*, 4, 279—283.

30. Vendrely, R. A. Knobloch, and C. Vendrely,; 1960. A comparative biochemical study of nucleohistones and nucleoprotamines in the cell nucleus. in "The Cell Nucleus", Butterworths, P. 200—205.

31. Yasuzumi G. and Hiroshi Ishida; 1957. Spermatogenesis in animals as

revealed by electron microscopy. II. Submicroscopic structure of developing spermatid nuclei of grasshopper. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **3**, 5, 663—668.

32. Рачкас Э. и В. М. Митюшин,: 1967. Структура нуклеопротеида в головках сперматозоидов вьюна. Цитология, **9**, 7, 818—822.

33. Ris, H.; 1962. Интерпретация ультраструктуры клеточного ядра. вкн: «ультраструктура и функция клетки». Изд.«МИР», 1965, Москва, стр. 41—48.

Die Abwechselung der basischen Kernproteine wahrend der Spermiohistogenese bei Amphibien

Li Dsing-yen

Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica

1. Bei den acht Arten Amphibien (*Hypselotriton wolterstorff, Rana grahami, Rana pleuraden, Rana sp., Kakoula verrucosa, Calluela yunnanensis, Hyla annectans, Bufo melanostictus*), die zu den Familien *Salamandridae, Ranidae, Microhylidae, Hylidae* bzw. *Bufonidae* gehören, wird die Verändrung der basischen Kernproteine während der Spermiohistogenese mittels der cytochemischen Methoden geforscht.

2. Die Ergebnisse der cytochemischen Forschungen weisen nach, dass sich die basischen Proteine in den Spermienköpfen der allen acht Arten Amphibien von dem Histon in den gewöhnlichen Zellkernen, einschliesslich der Spermatidenkerne, unterscheidet, und dass sie mehr Arginin enthalten und starkere Basizitat als das Histon in gewohnlichen Zellkernen haben.

3. Mit der heissen Trichloressigsaure (5 %, 90°C) werden die Schnitten der mit Äthylalkohol fixierten Hoden bei den sechs Arten Amphibien behandelt und die Resultate werden verglichen. Alle Sorten gewöhnliche Zellkerne und alle Metapha sechromosomen werden nicht vernichtet, während die Spermienköpfe verschieden nach der Tierarten reagieren.

Die Spermienköpfe der Kröte Bufo melanostictus werden durch 5 Minuten Behandlung zum grössten Teil vernichtet und die verschwinden ganzlich nach 15 Minuten Behandlung.

Beim Frosch Rana grahami werden die Spermienköpfe durch 15 Minuten Behandlung zum grössten Teil zerstört.

Durch 15 Minuten Behandlunm werden die Spermienköpfe des Frosches Rana

pleuraden zum grossen Teil vernichtet. Wenn man 30 Minuten behandelt, verschwinden sie ganz.

Zum Kleinen Teil werden die Spermienköpfe des Frosches Calluela yunnanensis durch 15 Minuten Behandlung verniehtet. Erst nach 30 Minuten Behandlung werden sie zum grossen Teil zerstört.

Nur ein kleinster Teil der Spermienköpfe des Frosches Kakoula verrucosa wird 15 Minuten Behandlung nach zerstört. Wenn man auch 30 Minuten behandelt, werden sie noch nur zum kleinen Teil vernichtet.

Erst durch 30 Minuten Behandlung fangen einige Spermienköpfe des Frosches Hyla annectans zerstört zu werden an.

Wenn die Behandlung mittels der heissen gesattigten wässerigen Löaung der Pikrinsäure (60°C, 3 Stunden) an die Stelle der mittels der heisson Trichloressigsäure tritt, werden die Spermienköpfe der Frosche Rana grahami und Rana pleuraden und die der Kröte Bufo melanostictus durch Behandlung nicht zerstört.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die basischen Proteine in den Spermienköpfen von *Bufo melanostictus, Rana grahami,* und *Rana pleuraden* zu Protamintyp gehören, das von Calluela yunnanensis vielleicht auch Eiweiss von Protamintyp ist, und das von Kakoula verrucosa und von *Hyla annectans* wahrscheinlich basische Proteine zwischen Protamin und Histon sind.

Deshalb sind die basischen Proteine in Spermienköpfen mannigfaltig und verschieden nach Tierarten. Bei Amphibien gibt es eine kontinuierliche Reihe von basischen Spermienkopfproteinen, welche verschiedene Protamine und Proteine zwischen Protamin uns Histon enthalten.

4. Die Folgerung von H. Y. C. Hew und D. P. Bloch, dass die Abwechselung der basischen Kernproteine während der Spermiohistogenese bei Frosehen nicht vorkommt, ist durch unsere Forschungsergebnisse niedergeworfen geworden. Die mögliche Ursache, warum sie solch eine Folgerung gemacht haben, ist analyziert geworden. Unsere Arbeitserfahrungen zeigen an, dass um zu beweisen, das basische Protein in Spermienköpfen und das in gewohnlichen Zellkernen gleichartig sind, man die serienmassigen Versuche (Z. B. die Versuche mit verschiedenen Behanglungszeiten usw.) machen muss, und dass die beiden basischen Proteine gleich unter allen Fallen reagieren, beweist. Aber die nämlichen Arbeite haben gerade H. T. C. Hew und D. P. Bloch nicht gemacht.

5. Die gegenwärtige und frühere Arbeite von dem Verfasser und die bezügliche Literaturangaben weisen nach, dass die Abwechselung der basischen Kernproteine während der Spermiohistogenesn weit und breit unter Metazoen exitiert, und dass die basischen Proteine in Spermienköpfen verschieden nachs Tierarten und mannigfaltig von typischem Protamin durch viele Sorten proteine zwischen

protamin und Histon bis Eiweiss von Histontyp sind.

Der ununterbrochene Charakter der Reihe von basischen Proteinen in Spermienköpfen deutet uns darauf hin, dass nicht nur im Falle, dass das basische Protein in Spermienköpfen Protamin oder Eiweiss zwischen Protamin und Histon ist, sondern selbst in solch einem Falle, dass das Protein allerdings Eiweiss von Histontyp ist, die Abwechselung der basischen Kernproteine wahrend der Spermiohistogenese noch statthaben will. Im letzteren Falle wird das Histon in Spermatidenkernen von dem anderen Histon in Spermienköpfen ersetzt.

Auf dieser Crundlage stellt der Verfasser eine solche hypothetische Folgerung auf, dass im Bildungsvorgang der Geisselspermien (Nematospermien) von allen Tierarten das Histon in Spermatidenkernen gesetzmässig von dem basischen Protein mit stärkerer basizitat ersetzt werden muss, und diese Abwechselung im ganzen Verlauf wenigstens einmal stattfindet.

6. Die cytochemischen Forschungen uber die Kröte Bufo melanostictus und den Frosch Rana Pleuraden zeigen an, dass wahrend der Spermiohistogenese bei ihnen, wie bei Schnecke, das Histon in Spermatidenkernen zuerst von einem übergehenden basischen Protein ersetzt wird, und das letztere dann von Protamin ersetzt wird. Es sind die Fälle vielleicht sehr wenig nicht, dass die Abwechselung der basischen Kernproteine nicht nur einmal während Spermiohistogenese stattfindet.

照 片 说 明

照片1中的精巢为甲醛钙固定，照片二中的为甲醛固定，其他皆为纯酒精固定。

照片1、滇螈精巢、物镜20×、TCA—固绿法（作者的改良法）示碱性蛋白。精子核并不破坏。

照片2、无指盘臭蛙精巢，物镜90×，TCA—偶氮洋红法示碱性蛋白。在热TCA处理15分钟后，精子核大量破坏。残存的精子核中出现溶失成的空泡。有些精子核的断面已经只剩下一个轮廓。一般的细胞核完全不受影响。

照片3、同上。许多纵长的精子核已溶失得只剩下纵长的轮廓。

照片4、同上，但改用苦味酸代替TCA。精子核完全不破坏（注意单个的精子核）。

照片5、滇蛙精巢，物镜40×，苦味酸—偶氮洋红法示碱性蛋白。精子核不破坏。

照片6、同上，物镜90×，TCA—偶氮洋红法染色。示在热TCA处理15分钟后，精子核已经在破坏。照片中所示的是精子核的残段与其中的空泡。

照片7、同上，物镜40×，TCA（30′）—偶氮洋红染色。把TCA处理时间延长为30分钟，结果一般的细胞核仍然完好，但精子核束则变成了淡着色的云状结构。

照片8、同上、与照片7为同一视野。物镜90×，示用油镜观察时，可见照片7中的云状结构乃是精子核完全溶失后的精子束。可以看到精子核溶失以后所留下来的纵长

的空洞。

照片9多疣狭口蛙精巢，物镜40×，TCA—偶氮洋红法染色，示碱性蛋白。

照片10、同上，物镜90×，以TCA—福尔马林—偶氮洋红法显示特别富于精氨酸的碱性蛋白。结果只有精子核着色。

照片11、同上，物镜90×，以TCA—HNO_2—偶氮洋红法显示特别富于精氨酸的碱性蛋白。只有精子核着色。

照片12、云南小狭口蛙精巢，物镜90×，孚尔根反应。

照片13、同上，TCA（30′）—偶氮洋红法，经热TCA30分钟处理后，一般细胞核仍然存在，精子核则破坏得只剩下了残迹。

照片14、同上，物镜40×，以TCA—HNO_2—偶氮洋红法显示特别富于精氨酸的碱性蛋白。只有精子核着色。

照片15、华西雨蛙精巢，物镜90×，TCA（30′）—偶氮洋红染色。经过热TCA处理30分钟以后，精子核依然存在，但是有些精子核内已经出现了物质溶失所形成的小空泡。

照片16、同上，物镜20×，以苦味酸—HNO_2—偶氮洋红染色，显示特别富于精氨酸的碱性蛋白。只有聚集在生精小管管腔中的精子的核被着色。

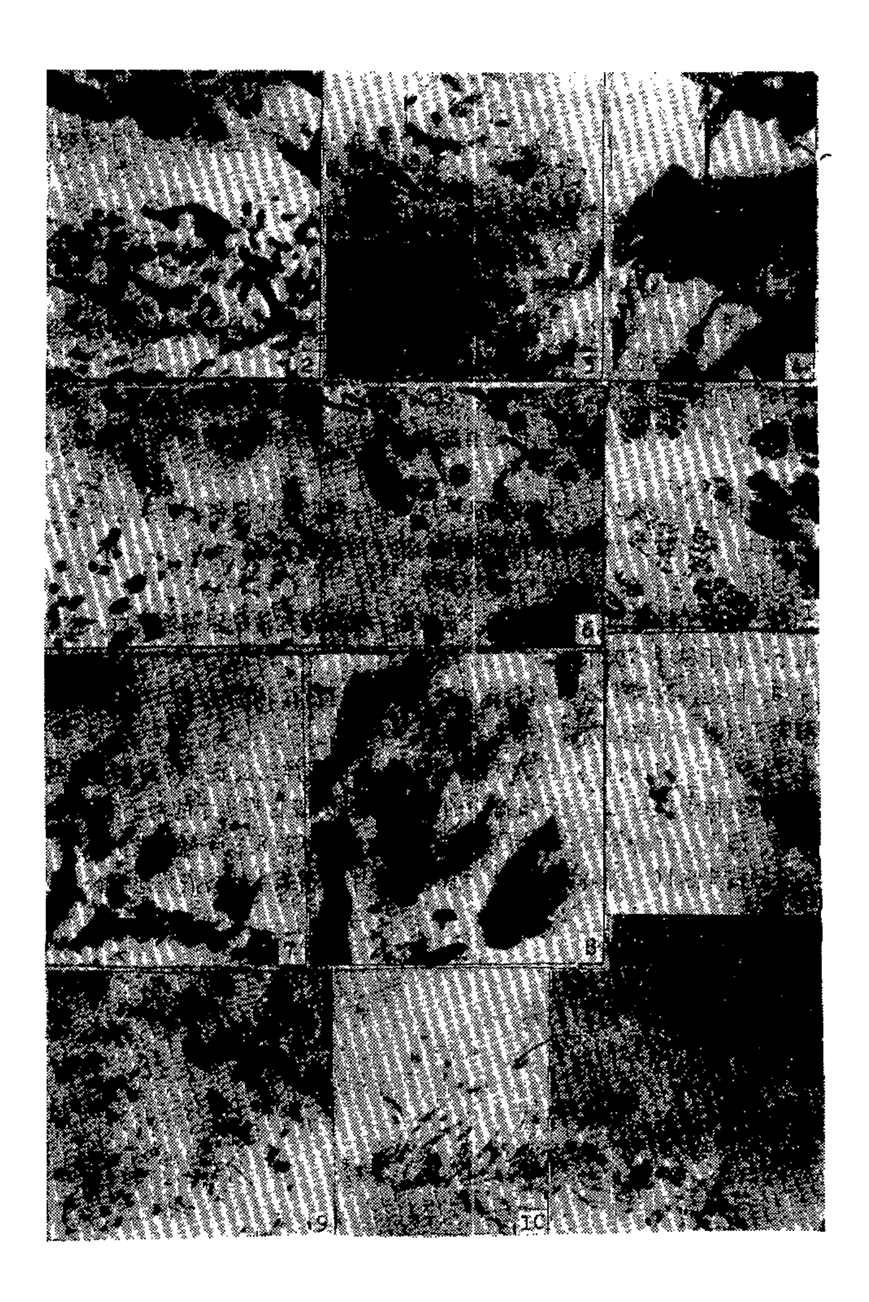
照片

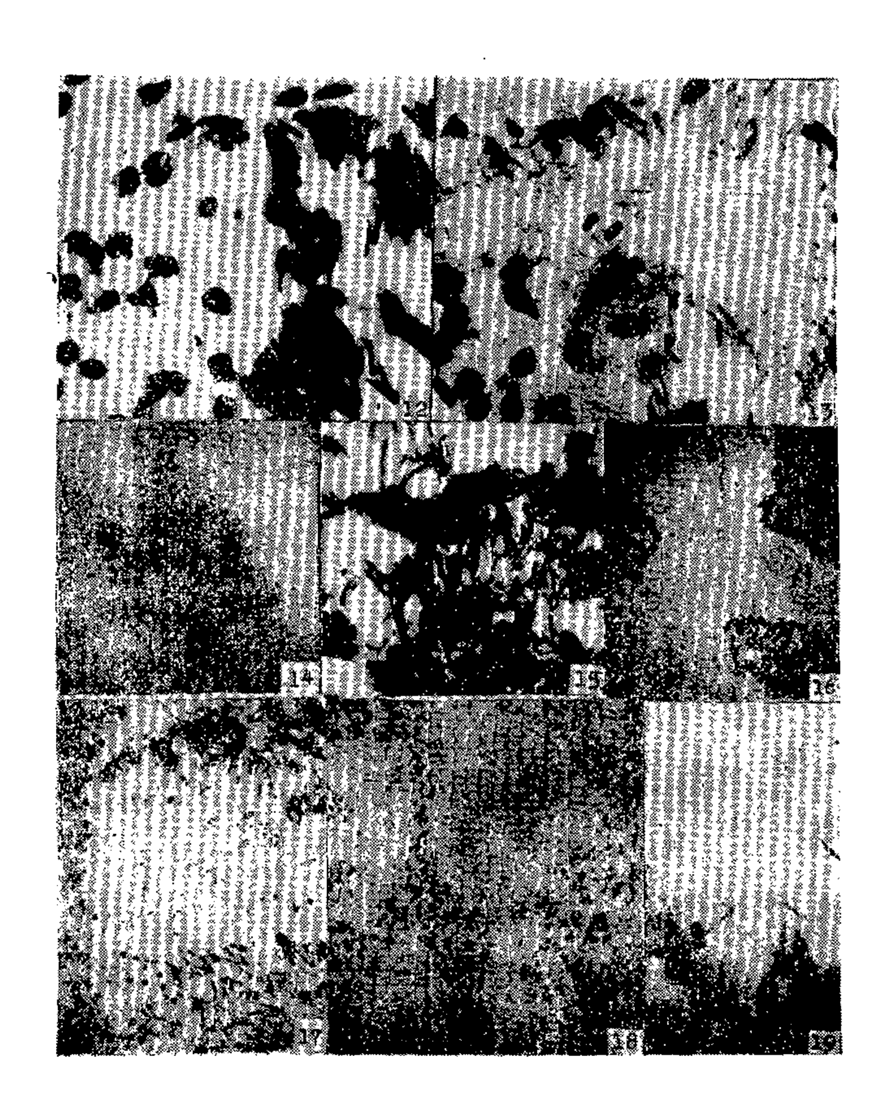
照片17、黑眶蟾蜍精巢，物镜20×，苦味酸—偶氮洋红法染示碱性蛋白。在热苦味酸的作用下，精子核并不破坏。

照片18、同上，改用TCA—偶氮洋红法显示碱性蛋白，结果在热TCA的作用下，精子核消失了（只在有些地方留有一些残迹）。

照片19、同上，物镜90×，以苦味酸—HNO_2—偶氮洋红法显示特别富于精氨酸的碱性蛋白。只有精子核与正在进行变态中的精细胞的核（发育形成中的精子的核）着色。

照片20、同上，改用TCA—HNO_2—偶氮洋红法显示特别富于精氨酸的碱性蛋白时，由于精子核为热TCA所破坏，切片中只有变态中的精细胞的核清楚地着色。




12
13
14
15
16
17
18
19